

DT05 Rec'd PCT/PTO 10 DEC 2004

DOCKET NO.: 259431US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroto KIKUCHI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP04/02592

INTERNATIONAL FILING DATE: March 2, 2004

FOR: PROCESS FOR PURIFICATION OF DIFRUCTOSE DIANHYDRIDE III

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

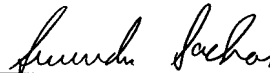
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

COUNTRY
Japan**APPLICATION NO**
2003-058929**DAY/MONTH/YEAR**
05 March 2003

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP04/02592. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

BEST AVAILABLE COPY

Rec'd PCT/PTO 10 DEC 2004

PC 2004/002592 #2

10/516307

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

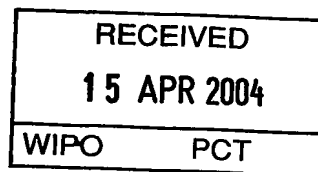
02.3.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月 5日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-058929
[ST. 10/C]: [JP2003-058929]



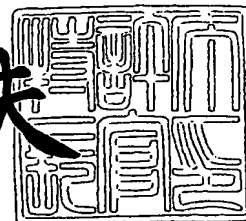
出 願 人
Applicant(s): 日本甜菜製糖株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 6664
【提出日】 平成15年 3月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】

【住所又は居所】 北海道帯広市稲田町南9線西13番地
日本甜菜製糖株式会社 総合研究所内

【氏名】 菊地 裕人

【発明者】

【住所又は居所】 北海道帯広市稲田町南9線西13番地
日本甜菜製糖株式会社 総合研究所内

【氏名】 高木 紀充

【発明者】

【住所又は居所】 北海道帯広市稲田町南9線西13番地
日本甜菜製糖株式会社 総合研究所内

【氏名】 櫻井 博章

【発明者】

【住所又は居所】 北海道帯広市稲田町南9線西13番地
日本甜菜製糖株式会社 総合研究所内

【氏名】 有塚 勉

【発明者】

【住所又は居所】 北海道帯広市稲田町南9線西13番地
日本甜菜製糖株式会社 総合研究所内

【氏名】 仙波 美博

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市西区発寒4条西5丁目7-8

【氏名】 富田 房男

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目1-2-307

【氏名】 浅野 行蔵

【特許出願人】

【識別番号】 000231981

【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番13号

【氏名又は名称】 日本甜菜製糖株式会社

【代理人】

【識別番号】 100075775

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 親男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067287

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9719179

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ジフルクトース・ジアンヒドリドIIIの精製方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 純度90%以上のジフルクトース・ジアンヒドリドIII（以下、DFA IIIという）を $R-B \times 10 \sim 60$ の濃度で含有するDFA III精製液に粉末活性炭を固形分に対して5%以下添加して清浄化した後、固液分離し、分離した液状部を濃縮した後、直ちに結晶化すること、を特徴とするDFA IIIの精製方法。

【請求項2】 純度90%以上のDFA IIIを $R-B \times 40 \sim 55$ の濃度で含有するDFA III精製液を使用すること、を特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 粉末活性炭を固形分に対して5%以下、好ましくは0.1%～3%添加使用すること、を特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 粉末活性炭の平均粒径が15～50ミクロンであり、最大粒径が200ミクロン以下であること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 固液分離する方法が、濾過助剤を使用する濾過、メンブランフィルターを用いる方法、限外濾過膜を用いる方法から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 DFA III含有液からDFA III製品に至る全精製工程における中間生成物の少なくともひとつをクロマトグラフィー処理して得られたDFA III画分を、精製工程の少なくともいずれかにおいて添加すること、を特徴とするDFA IIIの精製方法。

【請求項7】 請求項6においてクロマトグラフィー処理して得られたDFA III画分の内、純度85%以上のDFA IIIを含有するDFA IIIリッチ画分については、これをDFA III精製液として単独で使用するかもしくはDFA III精製液に添加すること、を特徴とする請求項6項に記載の方法。

【請求項8】 請求項7におけるDFA III精製液もしくはDFA IIIリッチ画分を添加したDFA III精製液に粉末活性炭を固形分に対して5%以下添加

して清浄化した後、固液分離し、分離した液状部を濃縮した後、直ちに結晶化すること、を特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】 純度90%以上のDFA IIIをR-B x 10～60の濃度で含有するDFA III画分をDFA III精製液として使用すること、を特徴とする請求項7又は8に記載の方法。

【請求項10】 粉末活性炭を固形分に対して5%以下、好ましくは0.1%～3%添加使用すること、を特徴とする請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】 粉末活性炭の平均粒径が15～50ミクロンであり、最大粒径が200ミクロン以下であること、を特徴とする請求項8～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 固液分離する方法が、濾過助剤を使用する濾過、メンブランフィルターを用いる方法、限外濾過膜を用いる方法から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項8～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 DFA III含有液からDFA III製品に至る全精製工程において、結晶化により結晶から分離されたシラップは、これを更に遠心分離して微細結晶を除去した後、精製工程の少なくともいずれかにおいて添加すること、を特徴とするDFA IIIの精製の方法。

【請求項14】 純度60%以上のDFA IIIをR-B x 10以上の濃度で含有するDFA III粗液に粉末活性炭を固形分に対して5%以下、好ましくは0.1%～3%添加して清浄化した後、固液分離し、分離した液状部を濃縮した後、直ちに結晶化することを特徴とするDFA IIIの精製方法。

【請求項15】 DFA III粗液が、DFA III含有液、クロマトグラフィー処理して得たDFA III画分、結晶又は粗結晶シラップの少なくともひとつであること、を特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】 粉末活性炭の平均粒径が15～50ミクロンであり、最大粒径が200ミクロン以下であること、を特徴とする請求項14又は15に記載の方法。

【請求項17】 固液分離する方法が、濾過助剤を使用する濾過、メンブランフィルターを用いる方法、限外濾過膜を用いる方法から選ばれる少なくともひとつ

つであること、を特徴とする請求項14～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 該DFA III含有液として、イヌリンにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させて製造した酵素反応液を使用すること、を特徴とする請求項15～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 フラクトースの重合度が10以上のイヌリンを使用すること、を特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】 フラクトースの重合度が10～60のイヌリンを使用すること、を特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】 フラクトシルトランスフェラーゼとして、イヌリンフラクトトランスフェラーゼ（デポリメライジング）（*inulin fructotransferase (depolymerizing)*）を使用すること、を請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 イヌリンフラクトトランスフェラーゼ（デポリメライジング）（*inulin fructotransferase (depolymerizing)*）として、アースロバクター エスピー（*Arthrobacter sp.*）AHU 1753株（FERM BP-8296）由来の精製酵素、粗製酵素、酵素含有物、菌体、菌培養物、同処理物の少くともひとつを使用すること、を特徴とする請求項21に記載の方法。

【請求項23】 請求項1～22のいずれか1項に記載の方法で得られた純度が95w/w%以上のDFA IIIの結晶、結晶粉碎物又は顆粒状物。

【請求項24】 フラクトースの重合度が10以上、好ましくは10～60のイヌリンにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させること、を特徴とするDFA III含有液の製造方法。

【請求項25】 フラクトシルトランスフェラーゼとしてアースロバクター エスピー（*Arthrobacter sp.*）AHU 1753株（FERM BP-8296）由来のイヌリンフラクトトランスフェラーゼ（デポリメライジング）（*inulin fructotransferase (depolymerizing)*）を使用すること、を特徴とする請求項24に記載の方法。

。

【請求項26】 フラクトースの重合度が10以上、好ましくは10～60であってポリサッカライド含量が80%以上のイヌリンを使用すること、を特徴とする請求項25に記載の方法。

【請求項27】 ポリサッカライド含量が100%のイヌリンを使用すること、を特徴とする請求項26に記載の方法。

【請求項28】 フラクトシルトランスフェラーゼが精製酵素であること、を特徴とする請求項26又は27に記載の方法。

【請求項29】 請求項28に記載した方法でDFA III含有液を製造し、これをクロマトグラフィー処理し、得られたDFA IIIリッチ画分を直ちに濃縮し、結晶化すること、を特徴とする高純度DFA III結晶の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ジフルクトース・ジアンヒドリドIII（以下、DFA IIIということもある）の精製方法に関するものであって、更に詳細には、DFA III含有液から高純度のDFA III結晶を、特に、再結晶処理を多数回くり返すことなく臭いまでも除去されて高度に精製されたDFA III結晶をきわめて効率よく得ることのできる工業的方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ジフルクトース・ジアンヒドリドIII (difructose dianhydride III: DFA III) は、フラクトース2分子が1, 2' ; 2, 3' で結合している難消化性二糖類であって (di-D-fructofuranose-1, 2' ; 2, 3' dianhydride)、水への溶解性が高く、蔗糖の90～95%程度を示すが、その甘味度は蔗糖の52%程度である。

【0003】

DFA IIIは、最近の本発明者らの研究により、Ca等ミネラルの吸収促進作用を有することが明らかにされ（例えば、特許文献1参照）、今後、特に高齢者や乳幼児等にとって、医薬上、健康食品、特定保健用食品、その他飲食品上、有

益な物質として期待されている。したがって、高純度のDFA III、特に取扱いのうえからもまた加工のし易さからも、結晶化したDFA IIIの製造、しかも研究試薬用のように小規模高コスト生産ではなく、大規模低コスト生産法の開発が待望されている。

【0004】

DFA IIIは、従来、イヌリン又はイヌリン含有物（例えば、キクイモ、ゴボウ、チコリ等の抽出液）に、細菌又はそれが生産する酵素フラクトシルトランスフェラーゼであるイヌリンフラクトトランスフェラーゼを作用させてDFA III含有液を製造した後、これを更に処理して高濃度DFA III液を得ている。

【0005】

例えば、DFA III含有液を活性炭カラムに通液してDFA IIIを吸着させた後、エタノールで溶離してDFA III含量の多い画分を回収し、蒸発乾固する方法が提案されているが（例えば、特許文献2、3参照）、この方法は実験室的な回収方法であって、工業的大量生産方法とはいいい難いものである。また、上記酵素反応によって得た液をイオン交換樹脂によって精製し、これを濃縮乾固する方法も提案されているが（例えば、特許文献4参照）、DFA IIIの純度が低く、高純度のDFA III結晶を得る方法とはいいい難いものである。しかも、従来の方法で結晶化したDFA III結晶は、他の不純物は除去できても、臭いまでは除去することができず、臭いの残留という欠点は不可避であった。たしかに再結晶によれば臭いの除去も一応は可能であるが、再結晶処理を多数回くり返す必要があり、そのたび毎に収率、歩留りが低下し、再結晶法は工業的な方法ではない。

【0006】

このように、臭いも除去した高純度DFA III結晶、しかもこれを工業的に大量生産するのに成功した報告は未だなされていないのが現状である。

【0007】

【特許文献1】

特開平11-43438号公報

【0008】

【特許文献2】

特公昭56-26400号公報

【0009】

【特許文献3】

特開平3-259090号公報

【0010】

【特許文献4】

特開平1-285195号公報

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

上記したように、近年、DFA IIIについて有用な用途が開発されるに伴い、DFA IIIの需要が高まってきている。そして医薬用途に使用する場合はもちろんのこと飲食品用途に使用する場合においても、DFA III以外の糖及び各種不純物を除去した高純度DFA III結晶が要望されており、特に、これらの用途においては不純物の内、色のほかに臭いが結晶中に残存しないことが要望されている。しかしながら、従来の方法では、結晶から臭いを除くことがきわめて難しく、多数回再結晶処理をくり返すことなく、臭いまでも除去してきわめて高度に精製された結晶化DFA IIIを効率良く工業的に大量生産することはできず、当業界においてこの問題点を解決することが要望されている。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記のように、従来の結晶化方法では工業的に臭いを除去することができなかったのであるが（換言すれば、結晶化しても臭いが残存していたのであるが）、本発明方法ではそれをはじめて可能にただけでなく、効率化、工業的大量生産にもはじめて成功したものである。

【0013】

すなわち、本発明者らは、各方面から研究した結果、DFA III含有液を粒状活性炭充填カラムに通液するのではなく、DFA III含有液に少量の粉末状活性炭を加えて攪拌した後、これをケイソウ土濾過、メンブランフィルター濾過等の固液分離処理を行って得られた液状部の濃縮液を結晶化したところ、高純度のD

F A III結晶がきわめて効率的に得られること、しかも純度95%以上、すなわち95~99%ときわめてピュアーなD F A III結晶が得られることをはじめて見出した。また、この研究の過程において、D F A III含有液をクロマトグラフィー処理して得たD F A III画分は、これに活性炭を加え固液分離した後の液状部は直接結晶化することも可能であること、しかもこれらの方法で得られた結晶には臭いがないこともはじめて見出した。

【0014】

本発明は、これら有用新知見に基づき更に検討研究を行った結果遂に完成されたものであって、従来なし得なかった臭いもなく高純度のD F A III結晶ないし顆粒状物の工業的大量生産の開発にはじめて成功したものであり、きわめて高価なD F A IIIを低コストで精製、結晶化すること、しかも従来わずかに実験室規模で行われていた再結晶を多数回くり返すことによる臭いの除去処理も実施する必要がないこともはじめて可能としたものである。

以下、本発明について詳述する。

【0015】

本発明は、D F A III含有液を精製して高純度のD F A III結晶を効率的に工業生産するものである。D F A III含有液としては、D F A IIIを含有し後記する条件を満たす液状物をすべて包含するものであって、イヌリン又はイヌリン含有液にフラクトシルトランスフェラーゼを作用させて得たD F A III生成反応液のほか、D F A III化学合成液や本精製工程において生成する各種精製度のD F A IIIを含有する液体がすべて包含される。

【0016】

例えばイヌリン（及び／又はイヌリン含有液）と酵素を用いてD F A IIIを製造する場合、イヌリンは、フラクトースが多数重合したもので、主にチコリ（あるいは、キクイモ、ゴボウ等）から抽出したものが使用されるため、重合度及び純度が異なるものが市販されているだけでなく、これを酵素によって分解すると、生成した反応液には、D F A III以外のフラクトース重合物、酵素、酵素源として使用した微生物、その培養物、色素、臭い等の不純物が含まれることは不可避であり、そのため、従来は、純粋なD F A III結晶又はその含有物を工業的に

低コストで効率良く得るまでには至っていない。

【0017】

酵素反応液の清浄法としては、既述のように、イオン交換樹脂及び活性炭カラムを用いる方法が知られているが（特許文献4及び2、3）、処理、操作が煩雑で効率的ではないだけでなく、他のフラクトース重合体を除去することがきわめて困難であるため、これらの重合体が残存してしまい、DFA III純度が低いという非常に大きな欠点は避けられないし、特に臭いが残存してしまう。

【0018】

また、活性炭カラムを使用する方法は、DFA IIIのほか他のフラクトース重合体、色素等の不純物を非選択的に一旦活性炭に吸着せしめた後、エタノールを用いて各種画分を溶出し、DFA IIIリッチ画分を集めて回収するものであって、少量のしかも粉末状の活性炭を酵素反応液に添加して不純物を吸着し（DFA IIIはそのほとんどが液中に残留する）しかる後に粉末状活性炭を除去する本発明に係る清浄化方法とはその原理自体が相違することはもとより、操作方法、操作効率、精製度が全く異なり、しかも使用する活性炭の種類、粒度、使用量が全然相違しており、本発明とは全く別異の方法であって、本発明の特許性とは関係のないものである。両者は、方法自体が全く相違しているのである。

【0019】

なお、特許文献4（イオン交換樹脂法）の実施例4において、キクイモ上清をセライト濾過して得た濾液を活性炭処理する工程が記載されているが、これは、キクイモ上清濾液は不純物が多くて後で行うイオン交換樹脂処理に支障をきたすためこれをスムーズに実施する目的で行う前処理ないし最初の単なる部分精製工程であって、そもそも本発明の活性炭処理とは技術的意義を全く異にするものである。しかも、使用する活性炭の粒度、使用量についての規定もなければ、処理対象として特定純度のDFA IIIを特定濃度含有する特定のDFA III含有液（本発明におけるDFA III精製液）についての記載すらなく（キクイモ上清濾液が本発明でDFA III精製液として使用する特定したDFA III含有液でないことは明白である）、そのうえ、本発明においては活性炭によって清浄化した後には結晶化工程が行われるのに対して、この方法においてはイオン交換樹脂処理が

行われていて全く相違しているだけでなく、そもそも結晶化自体が行われていない。ましてや脱臭もされていない。したがってこの方法も本発明に係る方法とは何らの関係もないものである。

【0020】

このように従来技術とは全く異なる本発明を実施して高純度のDFA III結晶を高収率で製造するには、出発粗結晶化原料として、純度60%以上、好ましくは70%以上のDFA IIIをR-Bx60以上、好ましくは70以上の濃度で含有するDFA III粗液を使用するのが好適である。この特定のDFA III粗液を使用することにより、純度95%以上、あるいは99%以上の純粋なDFA III結晶を回収率35%以上（対イヌリン）で効率的に大量生産することができる。DFA III粗液としては、DFA III含有液、クロマトグラフィー処理して得たDFA III画分、結晶又は粗結晶シラップの少くともひとつが使用される。

【0021】

このDFA III含有液は、フラクトース重合度が10以上、好ましくは10～100、更に好ましくは10～60のイヌリンを酵素処理すれば得ることができるし、また、純度の低いDFA III含有液であっても、クロマトグラフィー（以下、クロマトということもある）処理して、上記した特定のDFA III画分を分画して回収してもよい。必要あれば濃縮、遠心分離、濾過その他の常法によって成分調整を行い、上記した組成を有するDFA III含有液を調製してもよい。

【0022】

フルクトース単位を転移触媒して、DFA IIIの様なオリゴ糖を合成する酵素は、広義で「フラクトシルトランスフェラーゼ」である。フラクトシルトランスフェラーゼは、大きく2種類に大別される。（1）フルクトース単位（スクロースなどの2糖類を含む）を基質とし、これを加水・転移して、オリゴ糖を合成する酵素（場合として、多糖も合成する）。（2）イヌリンやレバンなどのフラクタンを基質とし、これを加水・転移して、オリゴ糖を合成する酵素である。発明者らがイヌリンからのDFA III製造に使用したのは、フラクトシルトランスフェラーゼの中でも、学名がイヌリンフルクトトランスフェラーゼであり、（2）の種類に属する。イヌリンフルクトトランスフェラーゼ（以後、単にIFTとす

る)を生成する微生物としては、アースロバクター属、クルイベロマイセス属、ストレプトマイセス属、エンテロバクター属に属する各種細菌、酵母、放線菌等が報告されており、これらを適宜使用することが可能である。これらの微生物を培養して、精製酵素、粗製酵素、酵素含有物、微生物培養物等の形態として適宜使用される。

【0023】

その非限定例を以下に示す: *Arthrobacter* sp. ; *Arthrobacter ureafaciens* IFO 12140; *Arthrobacter globiformis* IFO 12137; *Arthrobacter pascens* IFO 12139; *Bacillus* sp. ; *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*; *Streptomyces* sp. ; *Enterobacter* sp.

【0024】

これら微生物由来の酵素を使用する場合、分離精製した酵素のほか、粗精製酵素、微生物培養物、同処理物（培養上清、分離菌体、菌体破碎物等）も使用可能である。なお、DFA III結晶を食品用途に使用する場合には、酵素としてフラクトシルトランスフェラーゼ、特にIFTを使用するのが好適であって、上記微生物由来の酵素のほか、今回、特許生物寄託センターにFERM BP-8296として寄託された*Arthrobacter* sp. AHU 1753株は、IFT生産能にすぐれているので、本菌株由来の酵素は好適に使用可能である。

【0025】

なお、イヌリンの酵素分解によるDFA IIIの生成は、DFA III単独のものが生成されることが最も好ましいが、実際上ではDFA III以外のフラクトースの重合物が種々生成される。それが酵素分解液の純度の低下の原因となっている。このため、DFA IIIを結晶化するための原料として、イヌリン以外の不純物の混入量の出来るだけ少ないものや、また、DFA III以外のフラクトース重合物が生成しない酵素の選択が必要である。そして、このように精製されたDFA III含有液が得られれば、これをDFA III粗液として、直ちに本発明に係る清

浄濾過、結晶化工程に入っていくことができる。

【0026】

以下、結晶DFA IIIの製造フローの一例として図1に示した製造フローを参照しながら、本発明を詳細に説明する。

【0027】

イヌリンをイヌリン分解酵素で処理した後、酵素を失活させて、DFA III含有液（酵素反応液）を得る。この際、高純度DFA III結晶を効率的に製造するには、原料イヌリンとしては、フラクトース重合度が10以上、好ましくは10～60のものを使用するのがよい。酵素としては既述したものが適宜使用可能であり（好適例のひとつとしては、アースロバクター s p . A H U 1753株（FERM BP-8296）由来のIFTが例示される）、酵素処理及び失活は常法にしたがえばよい。このようにして、R-Bx 10以上、好ましくは15以上、更に好ましくは20以上、更に好ましくは20～30、DFA III純度60%以上、好ましくは65%以上、更に好ましくは70%以上、更に好ましくは70～85%のDFA III含有液を得る。化学合成によっても、同様にDFA III含有液を製造することができる。なお、原料イヌリンとしては、上記したようにフラクトース重合度が10以上のものが好適であるが、不純物を含有するイヌリン、例えばフラクトース重合度が5程度のものであっても、シラップの副生量が多くなり、循環処理する回数や量が多くなって効率面ではやや低下するものの、この製造で充分処理することができる。

【0028】

上記によって得たDFA III含有液のほか、これと同じ性質を有するクロマト処理して得たDFA III画分、結晶又は粗結晶シラップの少なくともひとつからなるDFA III粗液は、次に清浄濾過する。清浄濾過は、DFA III粗液の活性炭処理及び固液分離処理を指すものである。活性炭処理は、DFA III粗液に粉末活性炭を少量添加して、必要あれば加熱及び／又は攪拌して、DFA III以外の不純物を活性炭に吸着せしめる処理である。

【0029】

粉末活性炭としては、平均粒径が15～50ミクロン、好ましくは25～45

ミクロン、更に好ましくは約35ミクロン；最大粒径が200ミクロン以下、好ましくは170ミクロン以下、更に好ましくは150ミクロン以下、例えば147ミクロン以下のものが使用される。その添加量は、固形分に対して、5%以下、好ましくは0.1~3%、更に好ましくは0.5~1.5%とするのが良く、DFA III粗液の組成に応じて適宜規定する。

【0030】

固液分離処理としては、ハイフロスーパーセル（和光純薬製）やケイソウ土濾過等の濾過助剤を使用する濾過（例えば、セラミック濾過機による濾過：日本ボール（株）製PR-12型が使用可能）、メンブランフィルター（MF）濾過、連続遠心分離法、分子篩法、逆浸透膜法、場合によっては限外濾過（UF）膜の少くともひとつが適宜利用される。固液分離は、常圧、加圧、又は減圧の少くともいずれかで実施される。

【0031】

上記の内、例えば、限外濾過膜（UF膜）を使用する濾過、メンブランフィルター（MF）濾過、連続遠心分離処理によれば、ケイソウ土等の濾過助剤を使用することなく、直接固液分離することができる。MF膜としては、例えばセラミック膜（例えば、月島機械（株）商品名ダリア）等が使用可能であるし、連続遠心分離（5,000~25,000rpm、好ましくは8,000~15,000rpm；6,500~10,000G、好ましくは7,500~9,500G：例えば10,000rpm、8,200G）によれば、DFA III結晶（結晶粒径250~500 μ m）と微細結晶（DFA III以外の結晶、主に4、5糖類：結晶粒径100 μ m以下）とを分離することができるので、粗結晶シラップや結晶シラップの濾過にも適用できる。

【0032】

固液分離して得た濾液は、これを濃縮する。濃縮は、常法によって行われ、例えば蒸発濃縮缶等が用いられる。得られた濃縮液は、粗結晶母液であって、蒸発結晶化または冷却結晶化等常法にしたがって粗結晶化処理する。粗結晶化された母液は、粗結晶と粗結晶シラップに分離するが、それには、遠心分離が利用される。

【0033】

結晶化された母液から分離された粗結晶シラップ及び結晶シラップの濾過には、遠心分離、例えば連続遠心分離（例えば、アルファ・ラバル社製）を用いた固液分離が行われる。シラップ中には未結晶のDFA III以外のフラクトース重合度の異なるオリゴ糖が含有されている。フラクトース重合度が高い程、結晶化がし易く、結晶の粒径が小さいことが新たに判明した。この性質を利用してDFA IIIと他のオリゴ糖を分けることができる。これによりDFA III以外のオリゴ糖が除去されてDFA III以外のオリゴ糖の循環蓄積が防止でき、DFA IIIの結晶化原料の純度の低下を押さえることができる。このDFA III以外のオリゴ糖が循環蓄積されると粗結晶母液（濃縮液）の純度が低下し、効率的（工業的）に結晶化できる純度（粗結晶の場合、純度60%以上）を確保することが難しくなる。特に、粗結晶母液（濃縮液）の純度低下を防ぐためシラップの製造系外への排出を行う方法もあるがDFA IIIの損失となるので避けるほうが良い。

【0034】

DFA III含有液（粗液）の清浄濾過処理によって得た濾液は、常法によって濃縮する。例えば、砂糖等の製造で用いられるカランドリア型濃縮効用缶による濃縮し、濃縮液を得る。濃縮液は、濃度 $R-B \times 60 \sim 85$ 、好ましくは $65 \sim 80$ 、例えば77程度に濃縮すればよい。

【0035】

濃縮液は、粗結晶化するが、結晶缶を用いる蒸発結晶化、冷却結晶化等常用される結晶化処理が適宜利用される。蒸発結晶缶は、例えば砂糖製造用として用いられている結晶缶であればよい。冷却結晶缶は砂糖製造用として使用されているものと同様な形状の横型又は縦型のクリスタライザーが用いられる。このように、結晶缶に供給されるDFA IIIを含有した液体を粗結晶母液（濃縮液）という。DFA IIIの粗結晶化の際、結晶缶内に結晶が付着しないような処置をとるとよい。例えば攪拌機をそれに付設すると結晶率の上昇の効果がある。遠心分離機は砂糖製造用に用いられているものであればよい。DFA III粗結晶を乾燥させる場合には、常圧の場合、 $50 \sim 100^{\circ}\text{C}$ の温度条件下で行う。なお、減圧乾燥も可能である。

【0036】

粗結晶化工程により結晶が析出した母液（濃縮液）について、固液分離を行い、粗結晶（DFA III純度は95～98%程度にまで達する）と粗結晶シラップに分離する。固液分離処理は、既述した方法で行えばよく、例えば上記のように遠心分離機（500～6,000rpm、好ましくは1,000～5,000rpm、例えば2,000～4,000rpm、500G～3,000G、好ましくは800～2,000G、例えば約1,200G）で両者を分離し、粗結晶シラップは、固液分離し、又はすることなく、所望する場合、精製工程に戻してやり、粗結晶は水又は湯に再溶解して、再溶解液とし、これを製品結晶化用の結晶母液用のDFA III精製液として使用する。

【0037】

再溶解液（DFA III精製液：R-Bxは10～60、好ましくは20～55、更に好ましくは40～50、DFA III純度は90%以上、好ましくは90～98%となり、例えば95～98%程度にまで達する）は、上記粗結晶の条件と同様に、清浄濾過、濾液の濃縮、濃縮液（製品結晶母液）の製品結晶化、製品結晶及び結晶シラップの分離、製品結晶の乾燥、包装、DFA III結晶製品（純度98～99%以上、色もなければ臭いもない高度に精製された結晶）を製造する。なお、結晶から分離したシロップ（結晶シロップ、粗結晶シロップ）は、所望する場合、濾過し又は濾過することなく、DFA III含有液からDFA III製品に至る全精製工程（図1のフロー）の少くともひとつに戻してやる。

【0038】

また、本発明においては、クロマト分離法を利用してDFA III結晶を製造することも可能である。すなわち、DFA III結晶化全精製工程（図1）で生成する各種生成物をクロマト処理原液（R-Bx 40～75）として、これをクロマト処理し、DFA IIIを精製して結晶化することが可能である。そのクロマト処理による精製フローの一例を図2に示す。

【0039】

クロマト処理原液（R-Bx 40～75）は、クロマト処理して、DFA II画分を分離する。既述した再溶解液（DFA III液）と同様の精製度を有する

DFA IIIリッチ画分は、DFA III精製液として、これを清浄濾過、濃縮、結晶化することにより製品結晶を製造することができ（ルートA）、あるいは、上記再溶解液（DFA III液）に添加してDFA III精製液とし、これを結晶化することもできる（ルートB）。また、DFA IIIリッチ画分とは異なりDFA II含量が低いDFA III非リッチ画分及びごく少量しかDFA IIIを含まない非DFA III画分については、前者は製造フロー（図1に示すようなDFA III含有液からDFA III製品に至る全精製工程）の適宜個所に戻してやればよいし（ルートC）、後者について精製工程に導入するか、場合によっては廃棄する（ルートD）。

【0040】

DFA IIIを含む液体（純度40%以上）をクロマト処理する場合、処理液のDFA III画分は純度70～98%のものが得られるので、DFA III純度85%以上、好ましくは90～95%、場合によっては95～98%のDFA IIIリッチ画分は、ルートAにしたがって、清浄濾過、濃縮、製品結晶化することができる。したがって、例えば、粗結晶化工程を経ることなく粗結晶用の母液（濃縮液）をクロマト処理してDFA III画分（DFA IIIリッチ画分）を分離し、これをDFA III精製液として活性炭処理濾過後、この濃縮液を製品結晶母液として使用し、他は上記したのと同じ操作を行って、臭いもなく高度に精製されたDFA III結晶製品を得ることができる。もちろん、この画分を再溶解液に添加してDFA III精製液として使用するルート、例えばルートBでも可能である。また、上記で分離したDFA III非リッチ画分は、ルートCにしたがって、精製工程（DFA III含有液～DFA III製品の全精製工程）例えば図1の適宜個所に戻してやり、全体として無駄やロスを生じることなく、本フローを循環させて徹底的に効率化することができる。

【0041】

また、非常に不純物含量が少ないイヌリン、例えばフラクトースの重合度が10以上、好ましくは10～60であり、ポリサッカライド含量が80%以上、好ましくは100%のイヌリンを原料とし、そしてフラクトトランスフェラーゼとして精製酵素を用いてこれを処理し、そして得られたDFA III含有液をクロマ

ト処理し、得られたDFA IIIリッチ画分は、活性炭清浄濾過等を行うことなく、直接、濃縮し、結晶化することができる。得られたDFA III結晶は更に全くとなくきわめて高純度な結晶であり、高純度イヌリン及び／又は精製フラクトシルトランスフェラーゼを使用することにより、清浄濾過を行うことなく、しかも、分離、濃縮、結晶化の各処理はわずか1回で臭いのない高純度なDFA III結晶をきわめて効率的に製造することができる。

【0042】

クロマト分離法としては、その分離装置は固定床方式（ワンパス方式）、連続方式（疑似移動床方式）、半連続方式（固定床方式と連続方式の組合）が適用できる。その装置の充填イオン交換樹脂としては、クロマト用のNa形、K形、Ca形等の強酸性イオン交換樹脂が使用される。その樹脂は均一粒径のスチレンジビニルベンゼン系樹脂等が用いられている。イオン交換樹脂のメーカーから種々のクロマト用樹脂が販売されているが、糖液に適用できるものであればいずれも使用できる。クロマト処理は結晶母液のDFA III純度が低い場合、その純度を上げるのにも適宜使用される。

【0043】

以下、実施例をあげて本発明を更に詳しく説明する。

【0044】

【実施例1】

イヌリンのフラクトース重合度（分子量分布）

市販イヌリンを購入しフラクトース重合度を調査した。下記の条件で液体クロマトグラフィー分析装置を使用したクロマトグラムを図3に示す。

【0045】

1) イヌリンの分析サンプル

- イ. A社品
- ロ. B社品
- ハ. C社品
- ニ. D社品

【0046】

上記サンプルに係わるカタログの表示を下記表1に示す。

(表1)

サンプル	イ	ロ	ハ	ニ
化学構造	G F n	G F n	G F n	G F n
重合範囲			2 ~ 6 0	1 0 ~ 6 0
平均重合度		1 8	1 0 ~ 1 2	2 0 ~ 2 5
生 産		砂糖から 酵素合成	チコリ抽出	イヌリンの 分離
ポリサッカ ライド含量			約 7 0 %	1 0 0 %

【0047】

2) 分析条件

カラム : Dionex, CarboPac PA1, 4×250mm I.D.

カードカラム : Dionex, CarboPac PA1 Guard

カラム温度 : 室温

溶離液 : グラジエント

	0分	100分
	割合 (%)	割合 (%)
1 N N a O H	1 5	1 5
1 M N a O A c	0	4 5
水	8 5	4 0
カーブ N o .	—	2

検出器 : Dionex, Pulsed Electrochemical Detector

検出モード : Integrated Amperometry

パルス電圧 : E1: +0.05V (400 m sec), E2: +0.75V (200m sec),
E3: -0.15V (400m sec)

流速 : 1.0 ml/min
レンジ : 1 μ C
注入量 : 各0.1%水溶液を 5 μ l 注入
分析サイクル: 120 min

【0048】

3) 結果

各クロマトグラムの流出時間によるピーク値を比較する。リテンションタイムの経過に従って各ピークは重合度(分子量)の高いものとなる。

【0049】

(C社品) 流出時間約 6.5 min から約 40 min の間に約 40 個のピークが存在している。このピークの状態から流出時間 6.5 から 14.5 min のものが多いため重合度の低いポリサッカライドの割合が多い。

【0050】

(D社品) 流出時間約 14.5 min から 46 min の間に約 40 個のピークが存在した。このことから比較的重合度の高いポリサッカライドが多い。

【0051】

(B社品) 流出時間約 7.9 min から 30 min の間に約 30 個のピークがあった。流出時間 14.5 min 以上の割合が多いが 14.5 min 未満のポリサッカライドも含まれる。

【0052】

(A社品) 流出時間約 9 min から 41 min の間に 40 個のピークがあった。D社品と同様な傾向のピークを示したが、流出時間 6.5 から 14.5 min の間にも多少ピークが散見された。

これらの結果とカタログから推察すると滞留時間 6.5 min の重合度が 2 で、14.5 min のピークが重合度 10 と予想される。

【0053】

【実施例 2】

(1) IFT 酵素生産量及びイヌリンからの DFA III の反応収率

上記市販品 4 種のイヌリンを使用し、後記するフラクトシルトランスフェラー

ぜを使用して酵素反応を行い、DFA IIIの生成率を調査した。イヌリンを80℃のお湯で完全に溶解した後、60℃まで冷却する。そこにIFTを5000 unit/kgイヌリンを添加し、60℃、24時間攪拌しながら反応させる。反応液のIFT酵素生産量を下記の通り測定した。また、反応液を失活(80℃)させ、活性炭(太閤活性炭S)及び珪藻土(ラジオライト700)で清浄濾過し、清浄反応液を液体クロマトグラフィー(以下HPLCと記す。カラム:Shodex Sugar KS-801, 300×8mm I.D.、流速1ml/min、カラム温度80℃)を使用しDFA IIIを定量した。IFTの酵素生産量及びDFA IIIの生成収率の結果を表2に示した。

【0054】

その結果から明らかなように、酵素生産量及びDFA IIIの反応収率ともD社品が最も良かった。図3及び表2の結果からフラクトース重合度が高い分布のものほど、即ち、A社品及びD社品は重合度10以上のものと予想されるが、これらがDFA III収率がよかった。尚、イヌリンは、分子量(重合度)が高くなると溶解性が悪く、ハンドリングしづらくなるため、DFA IIIの工業生産には重合度100程度が限界である。

【0055】

(2) 酵素生産量(酵素活性)の測定法

2ml容チューブに10%イヌリン溶液0.5mlと0.1Mクエン酸・NaOHバッファー(pH5.5)0.45mlを入れ、60℃の湯浴で約5分間加温した。そこに、粗酵素液50μlを加え、60℃で10分間反応させた。沸とう水中に5分間保持することにより反応を停止させた。HPLCにより生成したDFA IIIを定量した。1unitは1分間に1μmolのDFA IIIを生成する酵素量とした。

【0056】

(表2) DFA IIIの酵素反応生成率

イヌリンの種類	酵素生産量 (units/ml)	DFA IIIの 反応収率(%)
---------	---------------------	---------------------

イ. A社品	96.2	71.3
ロ. B社品	80.3	57.8
ハ. C社品	68.9	53.8
ニ. D社品	102.4	76.5

【0057】

【実施例3】

イヌリンからDFA IIIの製造

(1) 上記D社品200kgを80℃のお湯1000kgで溶解し、60℃まで冷却する。その溶液に下記酵素生産で得られたIFT 5000units/kgイヌリンを添加し、60℃で24時間攪拌しDFA IIIの含有液を生成させる。この反応完了液を80℃に上げ酵素を失活させる。この失活液に固形分当たり1%の割合で太閤活性炭S（二村化学工業製：平均粒径約35ミクロン、147ミクロン以下）を添加し60℃、10分間攪拌する。この完了液を珪藻土（昭和化学工業製ラジオライト700）濾過を行った。すなわちセラミック製の筒（日本ポール（株）製PR-12型セラミックチューブ）の内面に上記珪藻土をブレコートしておき、筒内に活性炭含有反応液を加圧通過させて、加圧濾過し、筒外から濾液を回収した。

【0058】

(2) この濾液を濃縮缶で濃縮（60～70℃ 120mmHg以下）する。最終濃度R-Bx77まで濃縮した後、その母液を結晶化工程に移した。結晶は冷却結晶化法を行った。60℃の濃縮液を冷却缶外部に冷却外套及び攪拌機が設けられた缶で、23時間かけて15～20℃に冷却する。結晶の析出した母液を分離機（3000rpm、1200G）で粗結晶とシラップに分離する。その粗結晶（DFA III純度97%）を再溶解し、得られた再溶解液（DFA III精製液）を、上記条件と同様に活性炭処理、珪藻土濾過を行い濃縮、結晶化・分離し、製品結晶（DFA III純度99%）を得る。得られた結晶を50℃で通風乾燥し、DFA III7.2kg（水分0.1%）が得られた。この結晶は、着色もな

く臭いも認められなかった。

【0059】

(3) 上記(1)において、珪藻土濾過にかえてメンブランフィルター(MF)濾過を行った。

すなわち、酵素反応完了液(約R-B x 20)を失活させて、それに太閤活性炭Sを固形分当たり1%添加し、60℃、10分間攪拌する。それを、0.14 μmのメンブランフィルター(月島機械株式会社製:セラミック膜 TSK-TAMIダリア)を使用し、濾過を行った。濃縮率は10倍とした。結果を図4に示す。その結果から明らかなように、透過液量の低下もみられず順調に濾過できることを確認した。透過液は透明であった。

【0060】

(4) 上記(1)、(2)において、DFA III含有液(酵素反応完了液:濃度R-B x 60、DFA III純度78.6%、その他21.4%(主に4糖類および5糖類))について、以下によってクロマト処理を行い、下記する画分を得た(表3)。このようにして、通液量0.600~0.700 L/L-R画分を回収して、DFA III画分(純度97.3%)を得た。このようにしてクロマト分画して得たDFA III画分は、DFA IIIリッチ画分として、清浄濾過した後に濃縮して製品結晶母液として使用できるほか、粗結晶再溶解液(DFA III精製液)としてあるいはそれに添加して使用できることも確認された。また、DFA III純度76.8%画分は、例えばDFA III非リッチ画分としてルートCに利用できることも確認された。

【0061】

(表3)

画分 (L/L-R)	純度 (%)	回収率 (%)
0.500~0.599	76.8	61.4
0.600~0.700	97.3	32.9

【0062】

(クロマト処理条件)

クロマト用樹脂: Na型強酸性樹脂 (オルガノ製CR-1310型)

カラム: 22×525mm、200ml

クロマト処理原液: DFA III酵素反応液を失活した後粉末活性炭で清浄濾過した液。

R-Bx 60、DFA III純度 78.6%、

供給量 2.5% L/L-R

通液条件: 70℃、SV=0.6 (2.0ml/min)

溶離液: 水

回収フラクション: 5ml/フラクション

【0063】

【実施例4】

フラクトシルトランスフェラーゼの製造

(1) アースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) AHU 1753株 (FERM BP-8296) を下記の培養条件で培養し、酵素液を作成した。

【0064】

(2) 培地1: 1%グルコース、1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、pH7.0。500ml容の振とう坂口フラスコに、100mlを調製し、高圧蒸気殺菌をした。

培地2: 1%イヌリン、0.2%硝酸ナトリウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%リン酸二水素カリウム、0.01g/L硫酸第二鉄、0.5%酵母エキス、pH7.0。200L容のジャーファーマンター (日立製作所製、モデルFF-02) に、100Lを調製し、高圧蒸気殺菌をした。)

【0065】

(3) 培養 (酵素生産)

前培養; 保存スラント培地より、*Arthrobacter* sp. AHU

1753株の一白金耳量菌体を、無菌的に（培地1）に接種した。そして、27℃、24時間、振とう培養をした。振とう条件は、15センチ幅、120rpm。

本培養： 前培養で調製した培養液（フラスコ10本分、1L分）を、無菌的に（培地2）に接種した。そして、ジャーファーマンターを27℃で、17時間、運転した。通気量は、1vvm（100L/分）、攪拌数は、300rpm。

【0066】

（4）菌体回収、およびその他（3）で調製した培養液を、遠心分離器で菌体と上清とに分離し、上清をDFA III酵素液とした。酵素液をリン酸にて、pH5.5に調整後、マイナス20℃で保存した。

（結果）

この操作により、IFTを、

濃度： 300ユニット/ミリリットル（培養液）、（実験室レベルの3倍）

全量： 4.5×10^7 の7乗、ユニット量、（工業生産に対応できる十分量）

時間： 17時間、（実験室レベルより短時間）

に製造できた。

【0067】

（培養条件）

・ 前培養： 27℃、24時間、振とう培養

・ 本培養： 前培養液を本培養液に接種（本培養液量に対して1%の前培養液量）し、27℃、24時間振とう培養する。

【0068】

（酵素液の調整）

本培養液を遠心分離（2000G、4℃、20分）し、上澄みを酵素液として使用する。

【0069】

【実施例5】

DFA III顆粒状物の製造

DFA III結晶を乳鉢で微粉碎した後、DFA III100に対して水10を加

え、均一に混合した。これを押出し造粒機（不二パウダル（株）製、F I N E R Y U Z E R、型式E X R - 6 0、処理能力40～150kg/hr）にて造粒し、70℃の送風定温恒温機（ヤマト科学（株）製、型式D N 9 1 0）で3時間乾燥し、顆粒状D F A I I Iを製造した。

【0070】

熟練したパネラー20人により、結晶D F A I I Iと微粉碎D F A I I I、顆粒状D F A I I Iの官能試験を実施した。得られた結果を下記表4に示した。表4に示すように、微粉碎D F A I I Iは結晶D F A I I Iより甘味が強くなり、口溶けや甘味の切れが向上し、結果的に好ましいという結果が得られた。さらに顆粒状D F A I I Iでは微粉碎D F A I I Iに対して甘味の強さは変わらないものの、口溶けや甘味の切れが向上し、総合評価も高かった。

【0071】

（表4） 各加工処理をしたD F A I I Iの官能試験

結晶D F A I I Iに対する微粉碎D F A I I Iの評価			
甘み	口溶け感	甘味の切れ	総合評価
+1.2	+1.4	+0.5	+1.7
微粉碎D F A I I Iの評価に対する顆粒状D F A I I Iの評価			
甘み	口溶け感	甘味の切れ	総合評価
+0.1	+0.5	+0.2	+0.5

【0072】

甘み	口溶け感
+2：甘い	+2：良い
+1：やや甘い	+1：やや良い
0：どちらとも言えない	0：どちらとも言えない
-1：やや甘くない	-1：やや悪い
-2：甘くない	-2：悪い
甘味の切れ	総合評価

+2：さっぱりしている	+2：良い
+1：ややさっぱりしている	+1：やや良い
0：どちらとも言えない	0：どちらとも言えない
-1：ややしつこい	-1：やや悪い
-2：しつこい	-2：悪い

【0073】

以上のことから、口溶け感や甘味の切れなど、食味や食感において敬遠される面があった結晶 D F A III は、微粉碎後、更に顆粒化することで、これらの点を改善できることが確認された。

【0074】

なお、結晶化条件は、D F A III 冷却結晶化時の R - B x : 65 以上であった (50℃における溶解度より判断した)。

【0075】**【発明の効果】**

本発明によって、従来効率よく工業生産することができなかった高純度の D F A III 結晶の工業生産にはじめて成功した。しかも、本発明によれば、特定の活性炭処理と D F A III 含有液の純度向上との有機的結合によって、純度 99 w / w % にも達するきわめて高純度の精製された D F A III 結晶を効率的に工業生産できるだけでなく、従来法では再結晶を多数回くり返さなければ除去することができなかった結晶中の臭いの工業的且つ効率的除去にもはじめて成功したという著効も奏される。

【0076】

このように、本発明に係る D F A III 結晶は、単に純度が高いだけでなく、臭いがないというきわめて顕著な効果が奏されるので、医薬用途や飲食品用途に使用するのに特に適しており、例えばカルシウム吸収剤として自由に使用できる特徴も奏される。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

D F A III 結晶の製造フローの一例を示す。

【図2】

クロマト処理による精製フローの例を示す。

【図3】

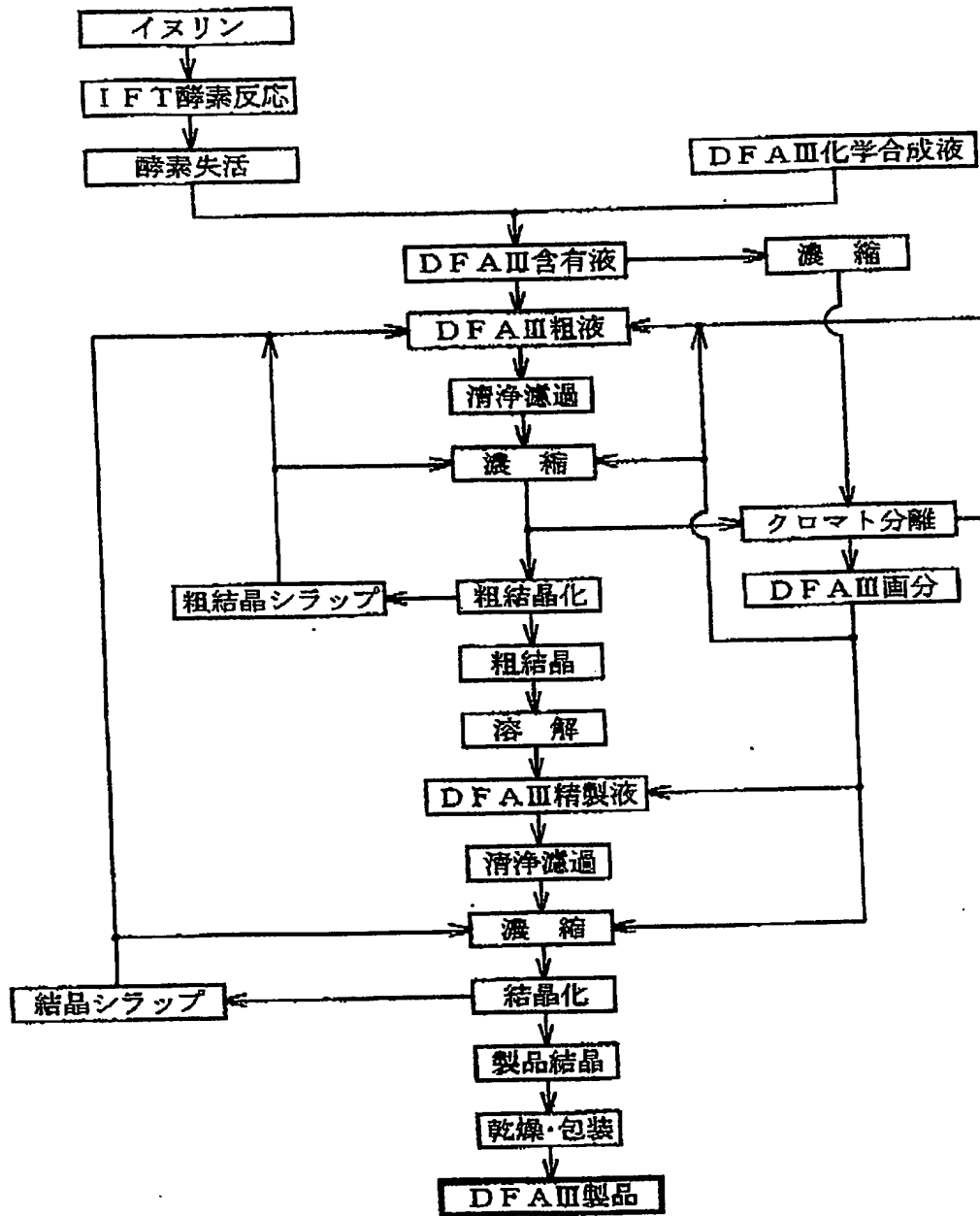
各種イヌリン商品の液体クロマトグラムである。

【図4】

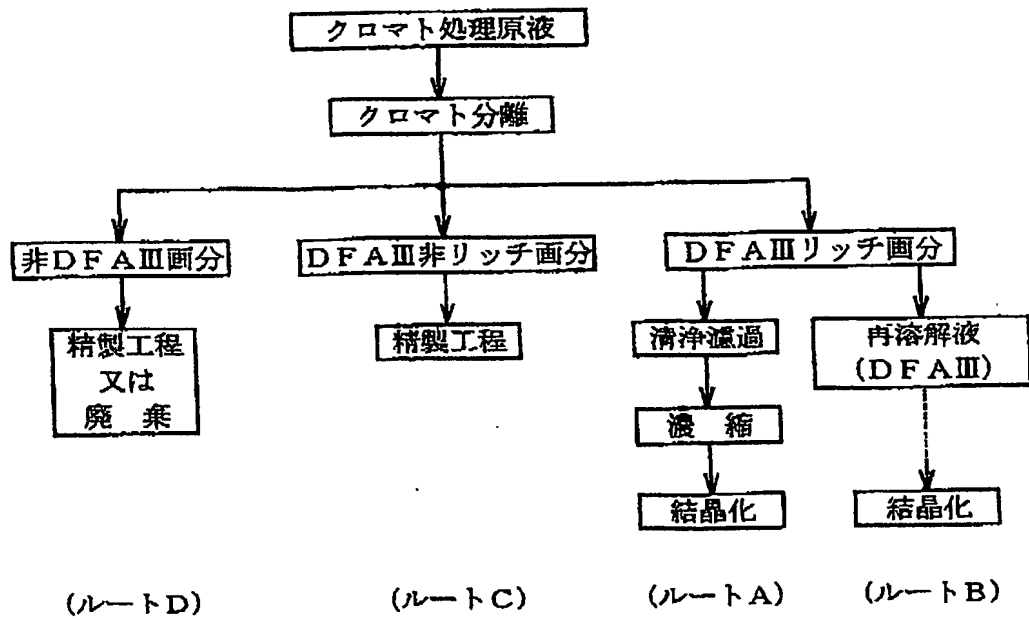
MF（メンブランフィルター）濾過試験の結果を示す。

【書類名】 図面

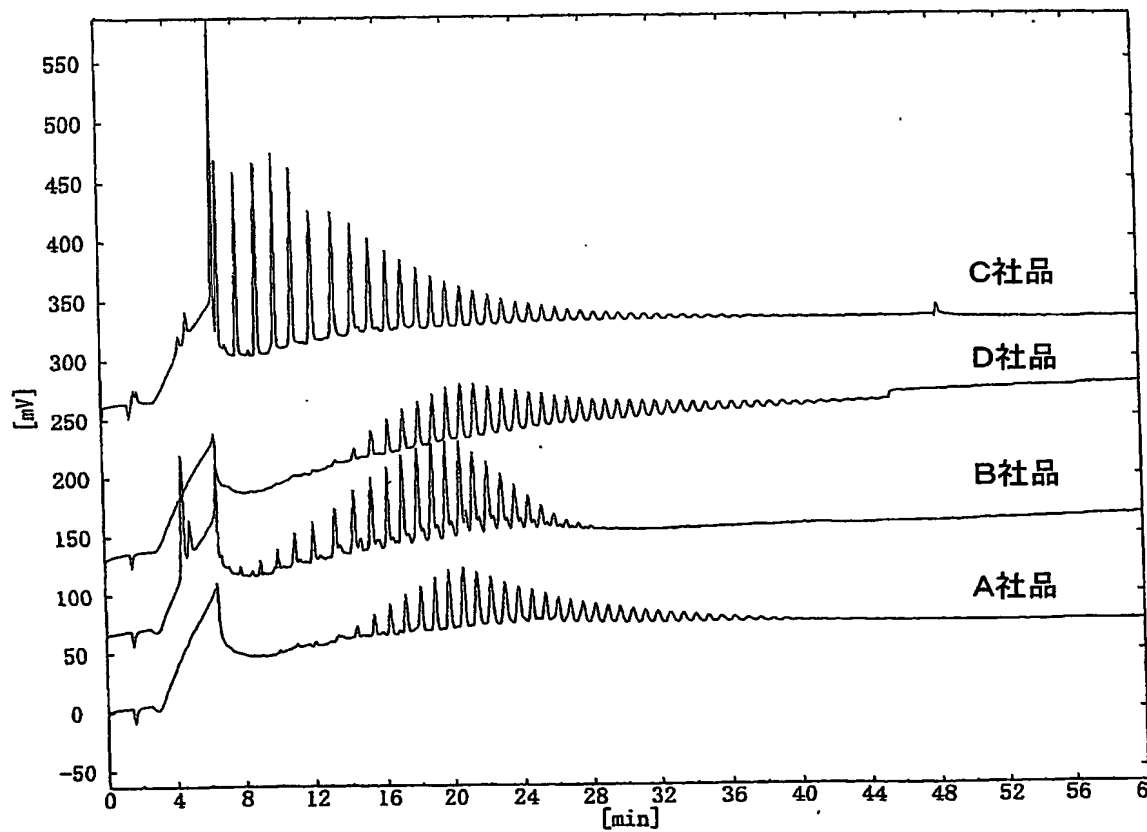
【図1】



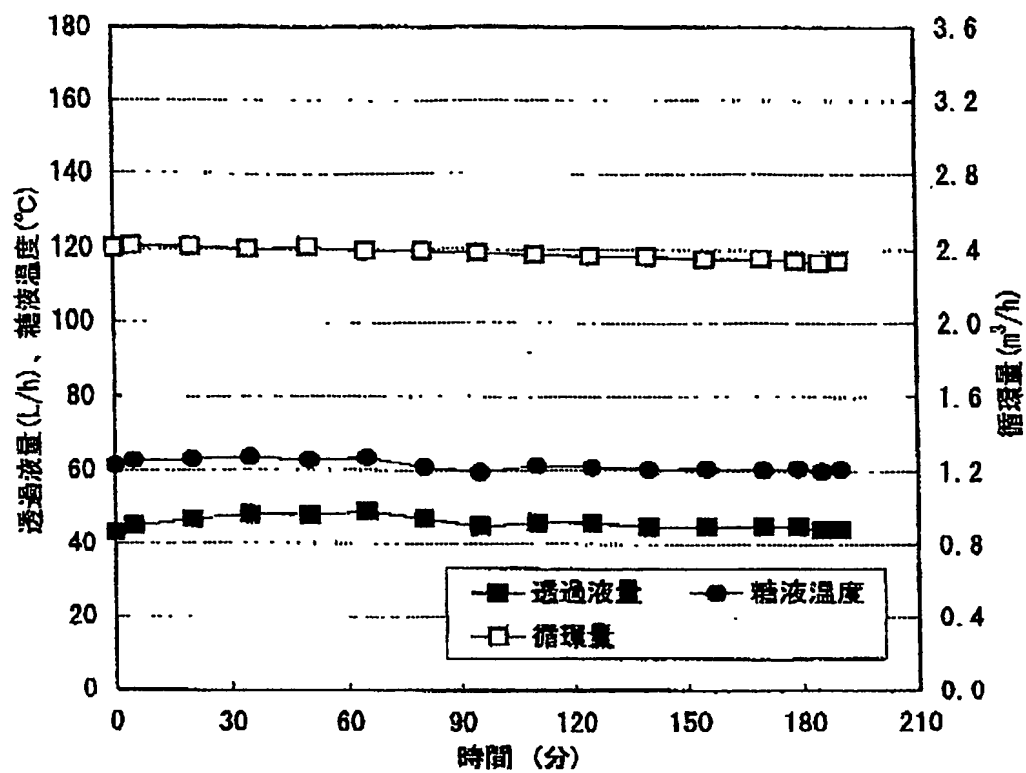
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 純度90%以上のジフルクトース・ジアンヒドリドIII (di-D-fructofranose-1, 2'; 2, 3' dianhydride、以下、DFA III) をR-B x 10~60、好ましくは40~55の濃度で有するDFA III精製液に、粉末活性炭を5%以下添加して攪拌した後、固液分離し(ケイソウ土濾過、メンブランフィルター濾過、限外濾過、連続遠心分離等)、分離液を濃縮した後、直ちに結晶化して、高純度のDFA III結晶を製造する。

【効果】 DFA III結晶が効率的に工業生産できるだけでなく、得られた結晶は従来品と異なり臭いがないという特徴を有するので、医薬品や飲食品用途に好適である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 5 8 9 2 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 3 1 9 8 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋 2 丁目 3 番 1 3 号

氏 名

日本甜菜製糖株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.